植物病理學會刊　11:179-188, 2002

臺灣荖葉與荖花疫病病原菌之鑑定

安寶貞[1,3]　黃櫶昌[2]　王姻婷[1]

1 台中縣　行政院農業委員會農業試驗所 植物病理系
2 台北市　行政院農業委員會動植物防疫檢疫局 植物防疫組
3 聯絡作者：電子郵件 pjann@wufeng.tari.gov.tw，傳眞：+886-4-23338162
接受日期：民國91 年10 月1 日

摘　要

安寶貞、黃櫶昌 、王姻婷**.** 2002**.** 臺灣荖葉與荖花疫病之研究**.** 植病會刊 11:179-188**.**

自 1978 年至 1998 年自荖花與荖葉栽培區分離疫病菌，其中 1988 年以前分離到的疫病菌均爲 *Phytophthora parasitica*，而 1990 年之後者均爲 *Phytophthora capsici*。調查時顯示，*P. parasitica* 主要自罹病根系與主莖分得，罹病植株出現生長衰弱等慢性立枯現象，最後終至死亡，甚而全園廢耕。而 *P. capsici* 除自罹病之根系與主莖分得外，在雨季亦經常自罹病葉片、花器與果實分得。本研究共分離到 16 株 *P. parasitica* 與 39 株 *P. capsici* 菌株，其中 *P. parasitica* 爲非標準型 (atypical type)，均爲 A^2 配對型；而 *P. capsici* 均爲 A^1 配對型，且完全爲標準型 (typical type)。*P. capsici* 菌株在 V-8 培養基上之菌落白色平滑，具不明顯的放射狀花紋；菌絲生長溫度 10-36℃，最適 24-32℃；在培養基上與水中會產生大量胞囊 (sporangia)，每一胞囊梗上著生 3-10 個胞囊。胞囊橄欖形、倒洋梨形或橢圓形，具顯著乳突 (semi-spherical papilla)；大部份胞囊具脫落性，胞囊柄(pedicels) 長平均 38.9 μm。胞囊大小平均爲 56.5 ×40.4 μm，胞囊長寬比平均爲 1.39。以分離到的 *P. capsici* 游走子懸浮液接種荖花扦插苗的根系與葉片，無論有無傷口，均可誘發病害，但有傷口時，發病較嚴重。接種葉片時出現的病徵與自然界發生者相同。自荖花分離的 *P. capsici* 對番椒具病原性，反之亦然，且兩者的菌絲蛋白質電泳圖譜幾乎完全一致。

關鍵詞：荖花、荖葉、枸醬、疫病、*Phytophthora capsici*、*Phytophthora parasitica*

緒　言

荖葉 (枸醬，*Piper betle* L.) 與荖花 (*Piper longum* L.) 屬胡椒科 (Piperaceae) 植物，在臺灣栽培的年代已久，目前主要分布於南投、台南、台東一帶。有關荖葉、荖花的病害，在第三版臺灣植物病害名彙中已記載的有十種 (3)，包括煤煙病、葉斑病 (*Cercospora piperis-betle* Sawada, *Phyllosticta piperis-betle* Sawada, *Helminthosporium* (?) *piperis-betle* Sawada 及 *Hendersonia piperis-betle* Sawada 等引起) (24) 、炭疽病(*Colletotrichum gloeosporioides* Penzig 引起)、白粉病 (*Sphaerotheca fusca* (Fr.) Blumer 引起) (23) 、疫病、根瘤線蟲 (*Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitwood 引起) (2) 等，這些病害部分爲早年 Sawada 的研究調查結果 (23,24) 。據台東縣荖花、荖葉產銷協會記載 (http://www.jage.idv.tw/disease.htm)，目前較重要的病害爲根瘤線蟲、細菌性角斑病、炭疽病、白絹病、白粉病及疫病等六種，其中疫病爲導致荖葉、荖花枯死的主因。

在臺灣，Chang & Shu (11) 最早於 1981 年報告荖葉的立枯病由 *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler 引起，1983 年更正爲 *P. parasitica* Dastur (= *P. nicotianae* Breda de Haan)) (12) ；而呂與高氏 (21) 於 1981 年在罹病的荖葉上分離到 *P. capsici* Leonion。爾後，一直沒有荖葉與荖花疫病的詳細報告。在此，作者等將數十年來田間荖葉、荖花上疫病菌的種類的變遷情形做一詳細報告。

材料與方法

病菌之分離與保存

將疑似罹患疫病的荖葉、荖花病組織採回，包括地下根、莖、葉片、花、果實等。病原菌的分離方法，係先將病組織洗淨、瀝乾水分。分離時 (a). 將地下根與莖部的表皮以小刀刮掉，沿病斑處切成約 10×5×2 mm^3 之小塊，(b). 葉片切成 5×5 mm^2，(c). 果實切成 5×3×2 mm^3，病組織經0.5% NaClO 溶液表面消毒一分鐘，以衛生紙瀝乾，放置於含有 20 ml 2%WA (water agar，水瓊脂) 或

5%CV-8A+AMP [20] (5% Clarified V-8 juice agar (Campbell Co.) + ampicillin, PCNB, and mycostatin) 半選擇性培養基之培養皿(直徑9 cm)內，置於24℃下，分離可疑病原菌。選擇性培養基的製作爲5%CV-8A (5% Clarified V-8 juice agar, 5%V-8 vegetable juice與0.2% $CaCO_3$ 混合後，經1500 rpm 低速離心5分鐘，取上層液，再加入2% Bacto agar (Difco Co.) 於滅菌後加入Ampecillin 100 ppm, PCNB (Penta-chloronitrobenzene) 10 ppm 及 Mycostatin 50 ppm。於分離後第二天開始，菌絲即陸續自病組織長出，經鏡檢發現長出者爲疫病菌時，切取前端菌絲，移植於新鮮之5% V-8A (5%V-8 vegetable juice agar，含5% V-8 Vegetable juice 與0.02% $CaCO_3$ 混合後，加入2% Bacto agar) 上。分離之菌經單游走子分離後，移植於5%V-8A上，在24℃下無光照培養3-5天，切取前端菌絲塊(10×5×5 mm^3)，保存於含無菌水之試管中 [10]，供下列各項試驗使用。

疫病菌之產胞

胞囊的產生：將供試菌株先在5% V-8A上培養3天，再移至光照定溫箱內(2000-3000 Lux, 24℃) 1-4天，每日鏡檢有無胞囊長出。或等菌株生長4-6天時，將含有先端菌絲的培養基切成5×3×2 mm^3 小塊，移植於裝有20 ml無菌水的玻璃培養皿(Pyrex Co.)中，再經光照處理。接種實驗時，則依Hwang等 [17] 研發的方法，讓供試菌株產生大量胞囊。供試菌株先在5% V-8A上培養3-5天，將先端的菌絲切成2×2×2 mm^3 小塊。配製含有20 ml的10%V-8A培養皿(9 cm diam., Pyrex Co.)，且鋪上一層滅菌玻璃紙(cellophane paper)。每皿放置9-12塊菌絲塊，在24℃無光照培養24 hr。再將含菌塊之玻璃紙移入另一滅菌培養皿內，倒入20 ml新鮮5%V-8J (不添加瓊脂的5%V-8A)，再於24℃黑暗中培養24 hr。第三天以礦物鹽液(mineral solution) 漂洗三次，每次間隔30 min。之後，將培養皿置於光照定溫箱內(2000-3000 Lux, 24℃) 1-4天，每日鏡檢，等待胞囊長出。胞囊長出後，在顯微鏡下觀察與測量胞子大小，每菌株測量100個胞囊。

游走子釋放(胞囊間接發芽)：產生胞囊的菌絲培養皿，每皿加入20 ml無菌水，置於15℃下低溫靜置30 min，再放回24℃約30 min，大部分成熟之胞囊均會間接發芽，釋放游走子(zoospores)。將游走子懸浮液濃度調節成每毫升含 10^{4-5} 游走子，供接種試驗。

配對型的測定與卵胞子的產生

配對型(mating type)的測定：供試菌株先在新鮮5%V-8A上培養3-5天，將先端的菌絲切成2×2×2 mm^3 小塊，移入含有10 ml的新鮮10%V-8A培養皿(6 cm diam., Pyrex Co.)的中央，每皿放置單一菌株，每皿3-4塊菌絲塊，在24℃無光照培養6-10天。爾後，在顯微鏡下鏡檢有無卵胞子產生。如有卵胞子形成，該菌均即爲同絲型(Homothallic)；如無則可能爲異絲型的，則依Ann & Ko [6] 發展的方法將供試菌株與標準菌株(*Phytophthora parasitica* 之P991 (A^1) 與P731 (A^2)) 對峙培養，測定供試菌株的配對型。方法爲將新鮮10%V-8A切成15×10×5 mm^3 大小，放置於直徑9 cm的培養皿內，沿邊緣排成一圈，每皿6-8塊。再將供試菌株的菌絲塊放在上述洋菜塊的一端，測試配對型的 A^1 或 A^2 菌株的菌絲塊放在洋菜塊的另一端，兩者約距0.5 cm。之後，將培養皿以蠟膜紙(paraffin paper)密封，外以鋁箔紙包裹，避免光線照射，於24℃下培養6天。經對峙培養後，如果僅與 A^1 配對培養會產生卵胞子者定爲 A^2 配對型，僅與 A^2 配對產生卵胞子者定爲 A^1 配對型；如果與兩者配對均可行有性生殖者定爲 A^1A^2,，而均不產生卵胞子者定爲 A^o。

卵胞子產生：利用Ko氏 [18,19] 發展之夾膜(Nuclepore membrane)方法，測定供試菌株產生之卵胞子(Oospores)的大小及Sexuality type。欲產生卵胞子的菌株先在新鮮20%V-8A瓊脂塊(20×15×5 mm^3) 上於24℃下無光照培養6天，而供作產生hormone刺激有性生殖產生的相對配對型菌株則在相同大小的培養基上生長24 hr。將一塊生長六天的菌絲塊放入9 cm培養皿中央，上面覆蓋一張滅菌的薄膜(polycarbonate membrane, 0.2 μm, 90 mm diameter; Nuclepore, Pleasanton, CA94566, USA)，再將生長一天具相對配對型、同樣大小菌塊，以菌絲面朝下的方向密貼其上。培養皿以蠟膜紙密封，置於24℃無光照培養6天。爾後，去除薄膜與上層菌塊，在相同條件下培養六天後，等待卵胞子成熟。同時在顯微鏡下觀察與測量藏卵器、卵胞子、藏精器的大小(每菌株測量50-100個)，並訂定供試菌株的sexuality type [19]。

菌絲生長與溫度的關係

配置5%CV-8A培養基，每直徑9 cm培養皿中含有20 ml。供試菌株先在5% V-8瓊脂上培養3-5天，將先端的菌絲切成2×2×2 mm^3 小塊(新鮮接種原)，移入含CV-8A培養皿的一端(約距邊緣1 cm)上。溫度每4℃一間隔，分成8,12,16,20,24,28,32,36℃等8處理，每一溫度兩培養皿，自第二天開始每日測量菌絲的直線生長速率，至菌絲長滿培養皿或第十天爲止。每處理兩皿，試驗重複一次。

疫病菌的鑑定

形態、生理特性比較：測定供試菌株的菌落形態、產生胞囊與卵胞子的條件、胞囊與卵胞子的形態與大小、是否會形成厚膜胞子與菌絲膨脹體、菌絲生長所需的溫度條件、及菌絲蛋白質電泳圖譜。再依疫病菌之分類文獻 [27,28]，予以鑑定之。菌落形態的觀察：將供試菌株於室溫

下 (24-28℃) 培養於含有 5%CV-8A 的 9 cm 直徑培養皿中培養 4-6 天。其餘形態與生理特性的測量在上述試驗中均有詳細說明。

菌絲之蛋白質電泳分析 [1]：配置新鮮 5%V-8J，每 250 ml 三角瓶中含有 50 ml 培養液。每一三角瓶中接種 5 塊供試菌株的新鮮菌絲塊 ($5\times5\times3\ mm^3$)，每供試菌株 2 瓶，放置於 24℃ 下培養 5-7 天。將接種菌塊挑出，經 0.05 M 之磷酸緩衝液(Phosphate buffer, pH 7) 漂洗三次，再經濾紙 (Filter paper, Bateman No.1) 濾乾水份, 放置於 -20℃ 下過夜。經冷凍處理之菌絲，在含有海砂 (sea sand) 及少量磷酸緩衝液之研砵中磨碎，再經離心力 27,000 g 低溫 (0-4℃) 離心 30 分鐘，離心後之澄清上層液 (clear supernatant) 供膠體電泳試驗 (gel electrophoresis)。依 Davis [13] 之方法，進行菌絲抽出液中蛋白質在 SDS-Polyacrylamide gel 上電泳分離，以比較荖葉、荖花菌株與其他寄主分離的 *P. capsici* 菌株(表二) 之蛋白質圖譜 (Protein patterns) 之異同。

病原性測定

接種原與供試植物：配製供試菌株的游走子懸浮液，調節成每毫升含 10^{4-5} 游走子。供試接種植物包括甜椒 (藍星，Blue star) 與荖花扦插苗。甜椒幼苗於室溫下 (25-28℃) 栽培於含有介質 (Bio-mix potting substratum, Tref Substrates Schoonebeek B. V., Netherlands) 的三寸塑膠花盆中，每盆兩株，生長約 1 月。荖花則自田間採直徑約 0.5 cm 粗的莖部，扦插於四號南海蛭石中，約生根後三個月內供試。接種前將荖花植株輕輕拔起，以水洗淨，以吸水紙吸乾水分後供接種試驗。

接種方法：荖花扦插苗之接種，配製游走子懸浮液 200 ml 倒入滅菌玻璃燒杯中，將燒杯放置於含冰塊的塑膠容器內保持低溫，再將 2-4 株扦插苗根系浸於游走子懸浮液中一小時，之後種植於含土壤的三寸缽中。接種後將接種植物置於陰涼溫度約 25-28℃ 處。發病情形之調查：荖花的罹病級數 (disease index) 分為三級 (2：萎凋死亡；1：根系腐敗，生長受阻；0：健康)，調查接種三個月時的發病級數，計算罹病度 (disease incidence) (%) = $(0n^0+1n^1+2n^2)$ / N X 100 (n^0, n^1, n^2 分別為各罹病級數的株數，N 為全部接種株數)。葉片的接種，先以 10 支昆蟲針 (no.3) 綁成一束，輕刺葉面一下，再將含有 0.5 ml 游走子懸浮液的消毒棉覆於葉片的傷口上，接種後將苗木置於塑膠袋內保持高濕一星期，再除去塑膠袋，調查二星期內葉片發病情形。每處理接種 10 葉片。罹病級數分為三級 (2：葉片掉落或病斑直徑 5 cm 以上；1：病斑直徑 (0.5-5 cm；0：無病斑或病斑直徑 0.5 cm 以下)。罹病度 (%) = $(0n^0+1n^1+2n^2)$ / N X 100 (n^0, n^1, n^2 分別為各罹病級數的葉片，N 為全部接種葉片數)。甜椒的接種，以消毒棉纏繞幼苗基部，將 1 ml 游走子懸浮液滴於消毒棉上，接種後將幼苗放置陰涼處，調查接種後兩星期內的幼苗死亡率，每處理 10 株。所有的對照處理均接種蒸餾水，實驗均重複一次。接種後並將發病的組織剪下，洗淨後，以 0.5% NaClO 溶液表面消毒三分鐘，以衛生紙瀝乾後，放置於半選擇性培養基上，於室溫下培養數天，觀察有無菌絲長出，來確定罹病部位是否為接種菌株所引起。

危害番椒與危害荖葉、荖花的病菌 *P. capsici* 的交叉接種試驗

將番椒分離到的疫病菌 *P. capsici* 三株與荖花上分離到疫病菌 *P. capsici* 四株做交叉接種實驗。荖花的接種選擇扦插苗的展開葉供試，番椒的接種選擇生長一個月大的甜椒品種藍星供試，接種與病害調查方法同前。對照處理接種蒸餾水。實驗同時，將危害夏威夷康乃馨 [8] 及進口西洋杜鵑 [5] 上分離得到的非標準型 *P. capsici* (*Phytophthora tropicalis* Aragaki & Uchida) 一併供試，測定其對甜椒與荖花的病原性，以茲比較。

結　果

病徵與病菌的分離

Phytophthora parasitica 的分離與其引起的相關病徵：台灣在 1980 年代，栽培 3-4 年以上的荖葉與荖花園經常出現慢性立枯 (slow decline) 的現象。地上部病徵：開始時，病株的葉片顏色變淡並稍微下垂，植株的生長日漸緩慢且衰弱，逐漸出現頂梢枯萎、葉片黃化掉落且新葉變小，最後整株死亡，嚴重時整園廢耕。地下部病徵：挖開生長較差的荖花根圈土壤，可見細根稀少，粗根嚴重壞疽腐敗，嚴重時連主根或莖基部組織都褐變崩潰。從罹病組織上可分離得到疫病菌 *Phytophthora parasitica* (= *P. nicotianae*)。此外，利用葉片誘釣法 [7]，將荖花葉片塊 ($1\times1\ cm^2$) 懸浮於於罹病荖葉與荖花的根圈土壤溶液上，均可誘釣得到相同的疫病菌。在 1977 與 1978 年兩年間共分得 16 菌株 (表一)，且均為 A^2 配對型 (mating type)。菌株特性與 1981 年 Chang & Shu [12] 對該菌的描述完全一致，不再在此重複。

Phytophthora capsici 的分離與其引起的相關病徵：10 年過後，在 1992-1996 年之間，再前往全台荖葉與荖花的產區 (包括南投、彰化、嘉義、台南、台東等地) 調查疫病發生的情形。在出現慢性立枯病徵(圖一、二) 的荖葉與荖花的腐敗根系上同樣可以分離得到疫病菌，但是所有分離到的疫病菌均為 *Phytophthora capsici*。此外，在連續降雨季節，疫病菌亦會危害荖葉與荖花的地上部組織，包括葉片 (圖三)、莖、花及果實。被害葉片首先出現水浸狀斑點，而後病斑迅速擴大成黑褐色大型斑點，鄰近病斑會互相癒合，造成葉片腐敗落葉。從新梢嫩莖到地基部直徑

表一、自台灣*Piper*屬作物分離疫病菌之情形

Table 1. Isolation of *Phytophthora* from diseased tissues of *Piper* species in Taiwan

Year	Location [1]	Host [2]	Source of isolation	Species of *Phytophthora*	No. of isolates, mating type and designation
1977	Tsaotuan, Nantow	*Piper longum*	Root	*P. parasitica*	4A^2, PPPb1-1～4
1977	Tsaotuan, Nantow	*P. longum*	Root	*P. parasitica*	6A^2, PPPb2-1～6
1977	Tsaotuan, Nantow	*P. longum*	Soil	*P. parasitica*	4A^2, PPPb3-1～4
1978	Minjien, Nantow	*P. longum*	Root	*P. parasitica*	1A^2, PPPb4
1992	Puli, Nantow	*P. longum*	Basal stem	*P. capsici*	7A^1, PcaPb1-1～7
1992	Shueili, Nantow	*P. longum*	Root & stem	*P. capsici*	4A^1, PcaPb2-1～4
1992	Shueili, Nantow	*P. longum*	Root & stem	*P. capsici*	4A^1, PcaPb3-1～4
1992	Tsaotuan, Nantow	*P. longum*	Root & stem	*P. capsici*	2A^1, PcaPb4-1～2
1992	Tsaotuan, Nantow	*P. longum*	Root	*P. capsici*	1A^1, PcaPb5
1992	Tsaotuan, Nantow	*P. longum*	Root & stem	*P. capsici*	4A^1, PcaPb6-1～4
1992	Tsaotuan, Nantow	*P. longum*	Root & stem	*P. capsici*	2A^1, PcaPb7-1～2
1992	Tsaotuan, Nantow	*P. longum*	Root & stem	*P. capsici*	2A^1, PcaPb8-1～2
1992	Shienyi, Nantow	*P. longum*	Root & stem	*P. capsici*	3A^1, PcaPb9-1～3
1993	Beiho,Tainan	*P. longum*	Root	*P. capsici*	2A^1, PcaPb10-1～2
1994	Tsaotuan, Nantow	*P. longum*	Root	*P. capsici*	3A^1, PcaPb11-1～3
1996	Tianwei, Changhua	*P. longum*	Root	*P. capsici*	4A^1, PcaPb12-1～4
1996	Taitung	*P. longum*	Stem	*P. capsici*	1A^1, PcaPb13
1996	Taitung	*Piper betle*	Stem	*P. capsici*	1A^1, PcaPb14
1996	Taitung	*P. betle*	Stem	*P. capsici*	1A^1, PcaPb15
1996	Taitung	*P. betle*	Leaf	*P. capsici*	1A^1, PcaPb16
1996	Taitung	*P. betle*	Leaf	*P. capsici*	1A^1, PcaPb17
1996	Taitung	*P. betle*	Root	*P. capsici*	1A^1, PcaPb18
1996	Taitung	*P. betle*	Basal stem	*P. capsici*	1A^1, PcaPb19
1996	Taitung	*P. longum*	Stem	*P. capsici*	1A^1, PcaPb20

5 cm以上老莖都可被感染，莖部感染後表皮褐化，患部並向莖中心侵入，造成組織嚴重褐變壞疽，導致被害莖部以上部位全部枯萎。花與果實染病後，組織褐化腐敗、提早掉落，氣候潮溼時，花器與果實上會長出白色霉狀物。從地上部罹病組織上分離得到的均為疫病菌，且均為*P. capsici*(表一)。

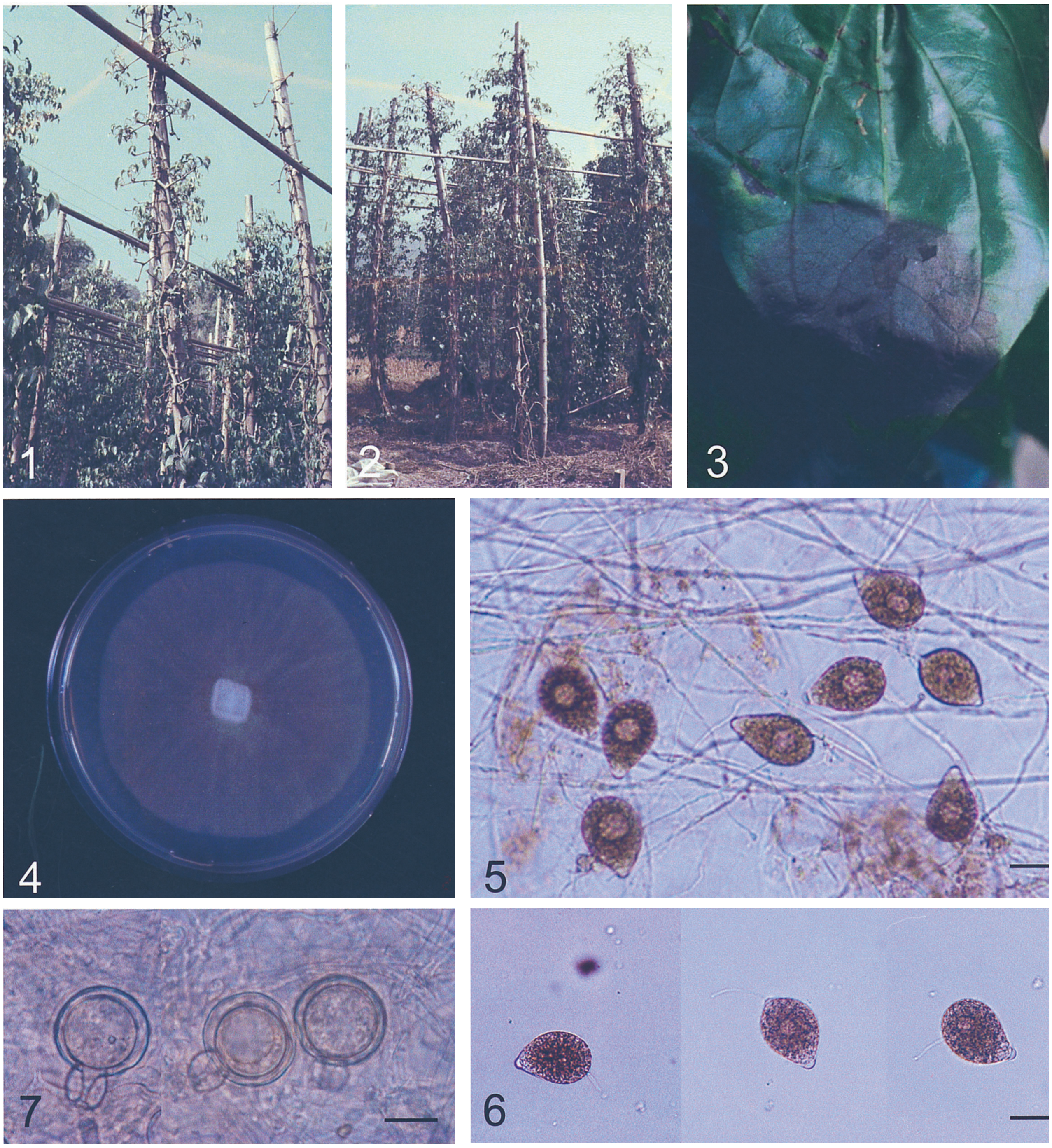
Phytophthora capsici 病菌特性與鑑定

自20果園內罹病的荖葉與荖花組織上共分得39株*P. capsici*。所有39個*P. capsici*菌株的菌絲均為白色透明，於室溫下(24-28℃)在5% CV-8瓊脂上生長之菌落形態平滑，具不顯著放射狀花紋，氣生菌絲稀少(圖四)。菌絲可在10-36℃生長，最適生長溫度為24-32℃(表二)。

在固體5%V-8瓊脂上，所有荖花與荖葉分離的*P. capsici*均易形成胞囊。將菌絲塊切下放入無菌水中光照時，或以礦物鹽液漂洗處理後[17]，形成的胞囊更多。胞囊的形成為unterminated，胞囊梗上先產生一個胞囊，再以先前胞囊為中心從旁邊長出兩個胞囊，如此重複數次，最後每一胞囊梗(sporangiophore)上約長有3至10個胞囊，胞囊的排列方式成傘狀。胞囊成橄欖型、倒洋梨型、檸檬型或橢圓形(圖五)，具顯著半球型乳突(papilla)，偶而有的胞囊有兩個乳突。大部份胞囊具脫落性，脫落率約50-90%，脫落的胞囊具長短不同的胞囊柄(Pedicel)(圖六)。荖花與荖葉疫病菌的菌落形態、胞囊大小與形狀、胞囊脫落率，會因菌株不同而略有差異。供試8菌株的胞囊大小為50-75×25-55 μm，平均為56.5×40.4 μm，胞囊長寬比1.0-2.18，平均1.39。胞囊柄長10-120 μm，平均38.9 μm(表三)。荖葉與荖花疫病菌菌株不會產生厚膜胞子(Chlamydospores)。

該菌在單獨培養時不形成卵胞子，但與*P. parasitica* A^{2}菌株P731對峙培養後會產生卵胞子，因此均為A^{1}配對型。當利用夾膜法[18]，將菌株與A^{2}配對型之標準菌株對峙培養後，測試菌株均會單獨產生卵胞子(圖七)。因此供試菌株屬Sexuality type S4 (可刺激A^{2}菌株，及被A^{2}菌株刺激以形成卵胞子)[19]。該疫病菌的藏卵器(oogonia)表面平滑，卵胞子為非充實性，藏精器(antheridia)單室底著。供試菌株有性生殖器官大小為：藏卵器為24-36 μm, 平均31.7 μm；卵胞子大小為20-30 μm，平均26.1 μm；藏精器大小為10-20×12-18 μm，平均15.1×14.8 μm。

不同地點分離的荖葉與荖花疫病菌的蛋白質電泳圖譜均完全相似(圖八)，且與番椒上分離到的*P. capsici*圖譜幾乎完全一致(圖八)。



圖一至圖七、荖葉、荖花疫病病徵及病原菌。荖花園出現嚴重立枯病徵(圖一、二) 與葉片病徵(圖三)。荖花疫病菌 *Phytophthora capsici* 在5%V-8A 上於24℃ 生長五天的菌落型態(圖四)、胞囊(圖五、六) 及卵胞子(圖七)。

Figs 1-7. Disease symptoms of piper infected with *Phytophthora capsici* and the pathogen. Slow decline of *Piper longum* (Fig. 1, 2) associated with root rot caused by *P. capsici* and a blight leaf (Fig. 3), colony on 5%CV-8A (5 days) (Fig. 4), and sporangia (Fig. 5, 6) and oospores. (bar=20 μm)

Phytophthora capsici 菌株病原性測定

將荖花扦插苗浸於游走子懸浮液(10^4 zoospores/ml) 中，再種植於土壤中，一星期後接種的植物開始出現萎凋情形，有些莖基部亦同時褐變。接種一個月時，植株死亡率達50% 以上。

荖花疫病菌的游走子侵入荖花組織不需要傷口。將含有游走子懸浮液的消毒棉覆於葉片上，在適溫(25℃) 高濕情形下，2-5 天後即會引起接種處出現褐色水浸狀斑點，褐色病斑迅速擴大，有些接種葉片會枯萎脫落，有些病斑會沿葉柄擴展到莖部，大部分接種部位在一星期內均會枯萎脫落，發病率在80% 以上。人工接種所造成的病徵與

表二、表列病原性測定或電泳試驗所使用疫病菌 *Phytophthora capsici* (包含 *P. tropicalies*) 菌株之資料

Table 2. List of isolates of *P. capsici* (including atypical type = *P. tropicalies*) used in pathogenicity test or electrophoresis study

Isolate no.	Host [1]	Location [2]	Year isolated	Typical or atypical type/mating type
PCaPb6-1	*Piper longum*	Tsaotuan, Nantow	1992	Typical, A^1
PCaPb9-1	*P. longum*	Shinyi, Nantow	1992	Typical, A^1
PCaPb10-1	*P. nigrum*	Beiho, Tainan	1993	Typical, A^1
PCaPb11-1	*P. nigrum*	Tsaotuan, Nantow	1994	Typical, A^1
PCaPb12-1	*P. nigrum*	Tianwei, Changhua	1996	Typical, A^1
PCaPb13	*P. longum*	Taitung	1996	Typical, A^1
PCaPb14	*Piper betle*	Taitung	1996	Typical, A^1
PCaPb15	*P. betle*	Taitung	1996	Typical, A^1
PCaPb16	*P. betle*	Taitung	1996	Typical, A^1
PCaPb18	*P. betle*	Taitung	1996	Typical, A^1
PCa38-1	*Capsicum annuum* var. *grossum* (sweet pepper)	Tsaotuan, Nantow	1998	Typical, A^1
PCa42-1	*C. annuum* var. *grossum*	Chiayi	2000	Typical, A^1
PCa48-1	*C. annuum* var. *grossum*	Shilo, Changhua	2001	Typical, A^1
PCaRh1	Indian azalea	Changhua, imported	1994	Atypical (= *P. tropicalis), A^o*
P129F	Carnation	Hawaii	1987	Atypical, A^o

表三、從 *Piper* 屬分離到 *Phytophthora capsici* 的胞囊的大小，及菌絲生長溫度的範圍

Table 3. Size of sporangia, and mycelial growth reactions to temperatures of isolates of *Phytophthora capsici* isolated from *piper* species

Isolate no.	Sporangia			Growth reaction to temperatures (℃)
	Length X width (μm)	Length/width	Pedicel (μm)	
PCaPb9-1	40-(54.5) [1]-60 X 35-(40.4)-50	1.07-(1.34)-1.67	15-(53.9)-90	10-(24-32)-36 [2]
PCaPb10-1	50-(63.4) -75 X 35-(43.2)-50	1.11-(1.46)-1.75	10-(37.5)-120	10-(28-32)-36
PCaPb11-1	50-(63.4)-75 X 35-(44.2)-55	1.22-(1.43)-1.71	10-(31.6)-95	10-(28-32)-36
PCaPb12-1	45-(57.4)-70 X 35-(40.4)-45	1.12-(1.42)-1.82	25-(45.2)-105	10-(24-28)-36
PCaPb13	45-(56.1)-72.5 X 35-(40.8)-50	1.13-(1.38)-1.80	10-(32.4)-85	10-(28-32)-36
PCaPb14	40-(53.6)-65 X 30-(40.2)-50	1.08-(1.33)-1.76	10-(35.6)-100	10-(28-32)-36
PCaPb15	35-(49.9)-65 X 25-(36.1)-48	1.0-(1.38)-2.18	10-(38.8)-100	10-(28-32)-36
PCaPb18	35-(53.9)-70 X 30-(38.2)-48	1.11-(1.41)-1.78	10-(36.5)-95	10-(28-32)-36

1. Data in parenthesis are in average.
2. Mycelial growth reactions to temperatures on V-8 agar are indicated as minimum -(optimum)-maximum.

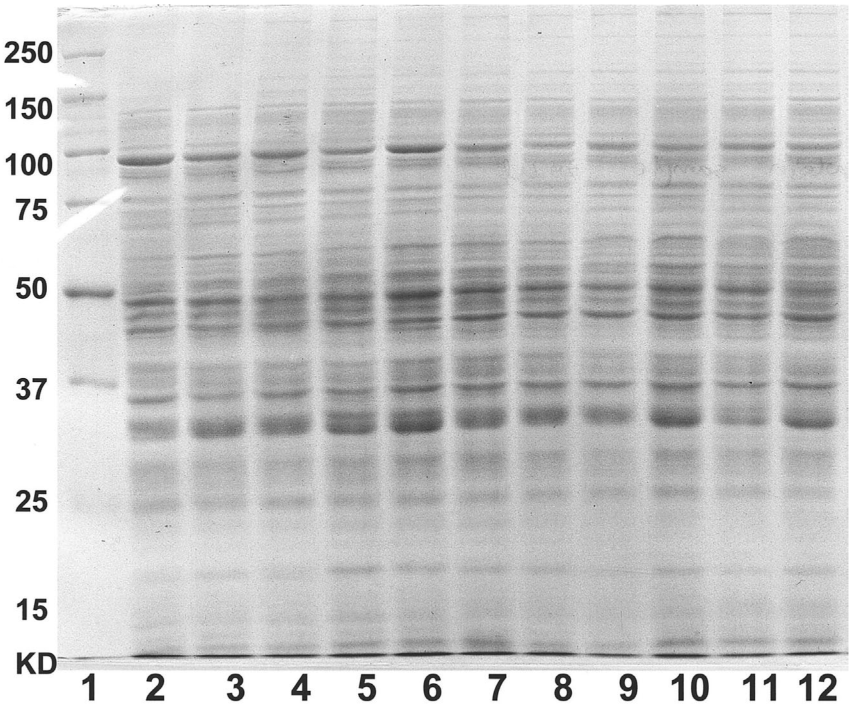
降雨季節田間的發病情形相同。而接種蒸餾水的對照處理在試驗期間則無發病。罹病組織經表面消毒後，可再分得相同之接種疫病菌 *P. capsici*。

危害番椒的疫病菌 *P. capsici* 與危害荖葉、荖花的疫病菌 *P. capsici* 的交叉接種試驗

將番椒分離到的疫病菌 *P. capsici* 三株與荖花上分離到疫病菌 *P. capsici* 四株做交叉接種實驗。結果自番椒分離的疫病菌可以感染荖花的扦插苗，並引起葉片腐敗與落葉；而同樣的，自荖葉、荖花分離到的 *P. capsici* 菌株可以感染甜椒藍星幼苗的莖基部，造成植株萎凋死亡，兩者間並無明顯差異 (表四)。但自夏威夷康乃馨 [8] 及進口西洋杜鵑上 [5] 分離得到的非標準型 *P. capsici* 均不能感染甜椒，以針刺接種荖花葉片時，僅造成直徑0.2 cm 以下的褐斑。

討　論

在印度與東南亞國家，有關胡椒 (black pepper, *Piper nigrum* L.)、荖葉 (betle vine, *P. betle*) 及荖花 (pepper, *P. longum*) 疫病的記錄很多 [14]，主要的疫病菌包括 *Phytophthora parasitica* (= *P. nicotianae*)、標準型 *P. palmivora* (Butler) Butler (*P. palmivora* MF1 & MF2)、非標準型 *P. capsici* (= *P. palmivora* MF4) 三種等。早年 (1990 年代以前)，國外對危害 Piper 的疫病菌屬於 *P. parasitica* 或 *P. palmivora* 一直爭論不休 [16]，主要原因在於病原菌特性介



圖八、荖葉、荖花分離的*Phytophthora capsici*與從番椒上分的*P. capsici*的菌絲蛋白質電泳(SDS page)圖譜比較。

Fig. 8. The SDS electrophoric patterns of mycelial protein of *Phytophthora capsici* isolated from different hosts including *Piper betle*, *P. longum* (No. 5-12) and *Capsicum annuum* var. *grossum* (No. 2-4) (Indication of line number: 1.protein marker, 2.PCa38-1, 3.PCa42-1, 4.PCa48-1, 5. PCaPb9-1, 6.PCaPb10-1, 7.PCaPb12-1, 8.PCaPb13, 9. PCaPb14, 10.PCaPb15, 11.PCaPb16, 12.PCaPb18.)

表四、比較從Piper與甜椒分離到的*Phytophthora capsici*菌株的病原性

Table 4. Comparisms of the pathogenicity of *Phytophthora capsici* isolated from Capsicum annuum and Piper.

		Disease incidence (%) [1]		
		Seedlings of sweet pepper	*Piper longum.*	
Inoculum	Host		Leaves	Seedlings
PCaPb9-1	*P. longum*	95	83	50
PCaPb10-1	*P. longum*	100	100	75
PCaPb11-1	*P. longum*	90	83	50
PCaPb12-1	*P. longum*	90	83	50
PCa38-1	*C. annuum* var. *grossum*	100	100	67
PCa42-1	*C. annuum* var. *grossum*	95	100	50
PCa48-1	*C. annuum* var. *grossum*	100	83	67
PCaRh1	Indian azalea	0	0	0
P129F	Carnation	0	0	0

1. Disease incidence of sweet pepper were counted as % seedling killed; leaf and seedling of *P. longum* as % $(0n^0+1n^1+2n^2)/N$. n^0, n^1, n^2 representing the numbers of inoculated plants or leaves of each disease grade and N indicating the total numbers of inoculated.

於兩者之間。他們認爲由 Piper 分離到的菌株與 *P. parasitica* 相似的特徵包括(a). 胞囊大部分具不脫落性、(b). 厚膜胞子與卵胞子的形態與大小、(c). 菌絲可以在35℃生長等；然而因胞囊的形態(胞囊較長，L/B 平均爲1.5)與*P. palmivora* 較相近，因此大部分的學者把它當成 *P. palmivora*。作者於 1977-1978 年在南投地區分離到的荖花疫病菌的特性亦是如此，與Holiday & Mowat [16]，Chang & Shu [12] 對該菌的描述完全相同。但是我們仍然認爲它應該屬於 *P. parasitica*，此與 Dastur 的觀點相同，最主要原因包括：(a). 標準型 *P. palmivora* 的胞囊脫落率幾乎爲100%，而且胞囊柄長度約爲2-5 μm；(b). *P. palmivora* 的胞囊在胞囊梗上著生的排列方式較密，且數目較多，有時可達 10-20 個胞囊。而荖花疫病菌相鄰胞囊間相距較遠，與*P. parasitica* 排列方式相同。此外，荖花疫病菌在5%V-8

上生長時呈嵌紋點狀(mosaic spot patterns)花紋，亦與*P. parasitica*相近。而當時學者認為"胞囊長寬比(L/B)大於1.2"的特徵在某些*P. parasitica*菌株中亦常見到，並非為分種的充分條件。

在台灣，Chang [11,12] 最早於1981年報告荖花疫病由*P. palmivora*(後更正為*P. parasitica*)引起，而同年Leu & Kao [21] 等即在荖花園分離到另一疫病菌*P. capsici*。十年以後，作者等在全台荖葉、荖花的主要栽培區調查與分離疫病菌，但是園內的疫病菌相已經改變，*P. parasitica*被*P. capsici*取代，不復被分離得到。

在1980年代以後，國外有許多報告指出從前在pipers上出現的*P. palmivora*並非標準型的MF1或MF2型，而是MF4型，與一些危害澳洲胡桃、木瓜等作物上的atypical *P. capsici*應該相同 [8,25]，因此將其更名為*P. capsici*。作者亦曾在康乃馨 [8] 與進口的西洋杜鵑 [5] 上分離到這種*P. capsici*，由於這一類的*P. capsici*對番椒無病原性 [8]，且形態、生理特性與Lionian [22] 當初的描述有相當的差異，故以atypical *P. capsici*稱之。最近，Aragaki & Uchida [9] 已正式將這種atypical *P. capsici*命名為*P. tropicalis* Aragaki & Uchida。然而在台灣，近年來在荖葉、荖花上分離得到的39株*P. capsici*均為標準型(typical type)，其特性與Lionian在1922年命名番椒疫病菌時的描述完全一致。同時所有菌株的配對型均為A^1 mating type，與目前台灣已發現的typical *P. capsici*菌株的配對型一致，尚無A^2菌株出現。這些危害台灣Piper的疫病菌菌株為typical type的證據包括：(a). 胞囊著生排列方式如放射狀、或傘狀，數目3-10個(atypical type的胞囊數目較多，有時可達20個以上)。(b). 胞囊脫落性，胞囊柄長平均32-54 μm (atypical type平均80 μm以上) [4,9,14,25,26]。(c). 人工培養時不形成厚膜胞子(atypical type會形成)。(d). 卵胞子產生量多(atypical type幾乎不形成)。(e). 菌絲最高生長溫度可達36℃(atypical type最高為32-33℃)。(f). 對番椒具強烈毒性(virulent) (atypical type無病原性或很弱)。(g). 菌絲蛋白質圖譜與番椒分離者一致。因此由以上各種形態、生理特徵、菌絲蛋白質圖譜及病原性測定的結果，均顯示自荖葉與荖花罹病組織分離到的疫病菌與危害番椒的*P. capsici*完全相同。

台灣近年來經濟進步，與國外的貿易交流絡繹頻繁，新的品種、物種不斷被引進。十數年來台灣亦有許多新病害被發現 [3]，其中也包括許多台灣新記錄的疫病菌。自從1977年*Phytophthora capsici*在台灣出現以後 [21]，造成了農業上嚴重的損失，重要寄主 [15] 包括番椒、番茄、茄子、瓜類、康乃馨、滿天星、大理花及荖葉、荖花等。Aragaki & Uchida [9,26] 認為標準型的*P. capsici*主要危害茄科(Solanaceae)與葫蘆科(Cucurbitaceae)作物，而危害可可、澳洲胡桃、木瓜的*P. tropicalis* (= 非標準型的*P. capsici*)，在自然界不會侵染番椒等作物。但在台灣，除了偶而在進口植物上直接分離到非標準型的*P. capsici*外，一般田間分離到的*P. capsici*均是標準型的，因此作者認為*P. capsici*的寄主範圍不應僅侷限於上述兩科作物。推想該菌在台灣寄主較廣泛的原因，可能因為台灣的耕地狹小而作物相太過複雜與密集，茄科、瓜類作物上的疫病菌*P. capsici*很容易藉流水與風雨的傳播而覓得新的寄主，目前荖葉、荖花上的疫病菌可能亦是從這兩種作物上傳染過來的。更有甚者，可能因為*P. capsici*的毒性較*P. parasitica*為強，兩菌之間可能存有拮抗作用，因此*P. parasitica*逐漸被取代而在荖葉、荖花田消失不見。欲明瞭台灣的*P. capsici*的寄主範圍為何較世界其他地區為廣泛，將來可經由DNA等分析予以詳細比較。很可惜的是1978年之前在荖花與荖葉上分離的*P. parasitica*已無菌株存活，將來無法與國外菌株比較。至於國外Piper上的疫病菌因鑑定引起的爭論問題，屬於*P. palmivora*、*P. parasitica*或*P. capsici* (or *P. tropicalis*)？或是也與台灣一樣，田間的疫病菌出現新種或被取代，均需詳細研究與探討。

誌　謝

本研究報告承行政院農業委員會經費補助，謹此致謝。

引用文獻

1. 黃德昌、安寶貞、許迪川. 1997. 荖葉、荖花疫病之病原及其防治. 植保會刊39(4):405-406. (摘要).
2. 蔡東纂、林奕耀. 1983. 臺灣中部荖花及荖葉根瘤線蟲病害之發生. 植保會刊25:281-284.
3. 蔡雲鵬. 1991. 台灣植物病害名彙(三版). 植物保護學會＆植物病理學會出版. 臺灣台中. 604頁.
4. Alizadeh, A. and Tsao, P. H. 1985. Effect of light on sporangium formation, morphology, ontogeny, and caducity of *Phytophthora capsici* and "*P. palmivora*" MF4 isolates from black pepper and other hosts. Trans. Br. Mycol. Soc. 85:47-69.
5. Ann, P. J. 2000. New disease records of flowering potted plants caused by *Phytophthora* species in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 9:1-10.
6. Ann, P. J., and Ko, W. H. 1988. Hormonal heterothallism in *Phytophthora parasitica*: a novel mode of sexual reproduction? J. Gen. Microbiol. 134:2985-299.
7. Ann, P. J. and Ko, W. H. 1994. An asexual variant of *Phytophthora insolita*. Can. J. Microbiol. 40:810-815.
8. Ann, P. J., Kunimoto, R., and Ko, W. H. 1990. *Phytophthora* wilt of carnation in Taiwan and Hawaii. Plant Prot. Bull. 32:145-152.
9. Aragaki, M., and Uchida, J. 2001. Morphological

distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. nov. Mycologia 93:137-145.

10. Boesewinkel, H. J. 1976. Storage of fungal cultures in water. Trans. Br. Mycol. Soc. 66:183-185.
11. Chang, H. S. 1983. Crop diseases incited by *Phytophthora* fungi in Taiwan. Plant Prot. Bull. 25:231-237.
12. Chang, H. S., and Shu, I. M. 1981. Betle decline in Taiwan. Bot. Bull. Acad. Sin. 22:1-7.
13. Davis, G. J. 1964. Disc electrophoresis. II Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121:404-407.
14. Erwin, D., and Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS press. Minnesota. 562 pp.
15. Ho, H. H., Ann, P. J., and Chang, H. S. 1995. The Genus *Phytophthora* in Taiwan. Acad. Sin. Mon. Ser. 15. Taipei, Taiwan, ROC. 86 pp.
16. Holiday, P., and Mowat, W. P. 1963. Foot Rot of *Piper Nigrum* L. (*Phytophthora palmivora*). Phytopathol. Pap. 5. Comm. Mycol. Ins. Kew, Surrey, England. CMI Press.
17. Hwang, S. C., Ko, W. H., and Aragaki, M. 1976. A simplified method for sporangial production by *Phytophthora cinnamomi*. Mycologia 68:1233-1234.
18. Ko, W. H. 1978. Heterothallic *Phytophthora*: evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. J. Gen. Microbiol. 107:15-18.
19. Ko, W. H. 1980. Hormonal regulation of sexual reproduction in *Phytophthora*. J. Gen. Microbiol. 116:459-461.
20. Ko, W. H., Chang, H. S., and Su, H. J. 1976. Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. Trans. Br. Myicol. Soc. 72:353-358.
21. Leu, L. S. and Kao, C. W. 1981. Pepper blight induced by *Phytophthora capsici*. Plant. Prot. Bull. 23:59-66.
22. Leonian, L. H. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. Phytopathology 12:401-408.
23. Sawada, K. 1919. Descriptive Catalogue of the Formosan Fungi 1: 150.
24. Sawada, K. 1959. Descriptive Catalogue of the Formosan Fungi 11: 142, 155,167, 202, 224.
25. Tsao, P. H., and Tummakate, A. 1977. The identity of a *Phytophthora* species from black papper in Thailand. Mycologia 69:631-637.
26. Uchida, J. Y., and Aragaki, M. 1989. Comparison of pepper isolates of *Phytophthora capsici* from New Mexico to other solanaceous and non-solanaceous isolates. Phytopathology 79:1219 (Abstr.).
27. Waterhouse, G. M. 1963. Key to the Species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Pap. 92. Comm. Mycol. Ins. Kew, Surrey, England.
28. Waterhouse, G. M. 1970. The Genus *Phytophthora* De Bary-Diagnoses (or Descriptions) and Figures from the Original Papers. Mycol. Pap. 122. Comm. Mycol. Ins. Kew, Surrey, England.

ABSTRACT

Ann, P. J. [1,3], Huang, T. C. [2], and Wang, I. T. [1] 2002. Identification of *Phytophthora* species on *Piper betle* and *P. longum* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 11:179-188. ([1.] Department of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C., [2.] Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Taipei, Taiwan; [3.] Corresponding author, E-mail: pjann@wufeng.tari.gov.tw, Fax: +886-4-3338162)

Species of *Phytophthora* in the fields of *Piper betle* and *Piper longum* in Taiwan were investigated from 1978 to 1996. *Phytophthora parasitica* was detected in all of the investigated fields before 1988, whereas only *P. capsici*, but not *P. parasitica*, was isolated from the diseased tissues of pipers in the fields from 1990-1996. According to investigations, *P. parasitica* was isolated from rhizosphere soil, diseased root and stem of the slow declining plants. The infected plants died eventually 3-5 years after appearance of declining symptoms. However, beside underground portions, *P. capsici* also attacked aboveground portions including leaves, stems and blossoms during rain. The fungus was most frequently isolated from these diseased tissues in wet season. A total of 16 isolates of *P. parasitica* were obtained in the early years. They all belonged to A^2 mating type and were not typical type. All of the 39 isolates, which were obtained after 1990, were typical *P. capsici* belonging to A^1 mating type. Colonies of *P. capsici* grown on V-8 agar were smooth with slightly radiate patterns. The minimum, maximum and optimum temperatures for mycelial growth were 10℃, 36℃ and 24-32℃, respectively. Isolates of *P. capsici* produced large amount of sporangia on V-8 agar as well as in water. Each single sporangiophore bore 3 to 10 sporangia arranging like an umbrella. Papillate sporangia were ovoid, obperiform or subspherical, and mostly deciduous with pedicel about 38.9 μm long in average. Chlamdspores were absent. Symptoms similar to those seen in the fields were observed when leaves and stems of cuttings of *P. longum* were inoculated with zoospore suspension of *P. capsici* obtained from *P. betle* and *P. longum* in pathogenicity tests. Wounding was not necessary for infection to take place but enhanced disease progress. The pathogen also caused root rot, wilt and death of the inoculated cuttings. *P. capsici* was reisolated from all artificially infected tissues. All tested isolates of *P. capsici* from *P. betle* and *P. longum* were pathogenic to sweet pepper and vice versa. Meanwhile, the SDS electrophoreic band patterns of mycelium protein of *P. capsici* from both hosts were almost identical.

Key words: *Phytophthora capsici*, typical type, *Phytophthora parasitica*, *Piper betle*, *Piper longum*